



FR 00 / 105

REC'D 04 FEB 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 JAN. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE/EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire ou lettres capitales.

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

27 JAN 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 00886 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75

DATE DE DÉPÔT

27 JAN. 1999

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Becker et Associés A.
10, rue de Milan

n° du 75009

Paris

éphone

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ diffère

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE DE PREPARATION DE VESICULES MEMBRANAIRES.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

1) AP CELLS INC.

2) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE

3) INSTITUT CURIE

Forme juridique
Société américaine

Etablissement public

Fondation reconnue
d'utilité publique.

Nationalité (s) 1) Américaine

2 et 3) Françaises.

Adresse (s) complète (s)

1) 1014 Hamilton Court - MENLO PARK, CA 94025

ETATS-UNIS

2) 101 rue de Tolbiac - 75654 PARIS CEDEX 13

FRANCE

3) 26 rue d'Ulm - 75248 PARIS CEDEX 05

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

BECKER Philippe
CPI n° 97-0800

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

B4174-PB

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 06886

TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE DE PREPARATION DE VESICULES MEMBRANAIRES.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A.

3, rue Chauveau-Lagarde

FR-75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

1) DHELLIN Olivier
60 boulevard de Charonne
75020 PARIS (France)

2) AMIGORENA Sébastien
124 boulevard A. Blanqui
75013 PARIS (France)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 27 janvier 1999

Philippe Becker
BECKER Philippe

CPI n° 97-0800

La présente invention concerne un nouveau procédé pour la préparation (en particulier l'isolement et/ou la purification) de vésicules membranaires. L'invention concerne également les vésicules membranaires ainsi préparées, ainsi que leurs utilisations biologiques et médicales, par exemple.

Les vésicules membranaires sont des vésicules, d'un diamètre généralement inférieur à 100 nm, composées d'une bicouche lipidique renfermant une fraction cytosolique. Des vésicules membranaires particulières sont plus spécifiquement issues de compartiments intra-cellulaires, par fusion avec la membrane plasmique d'une cellule, conduisant à leur libération dans les fluides biologiques ou dans le surnageant de cellules en culture. De telles vésicules sont désignées de manière générale par le terme exosome. Les exosomes possèdent généralement un diamètre compris entre 50 et 90 nm, plus particulièrement entre 60 et 80 nm, et portent avantageusement des protéines membranaires (notamment des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité) qui sont dans la même orientation que dans la membrane plasmique des cellules dont ils sont issus. Par ailleurs, selon leur origine, les exosomes comportent des protéines membranaires telles que CD40, CD80, HSP70 et sont dépourvus de réticulum endoplasmique et d'appareil de golgi.

La libération d'exosomes a été mise en évidence à partir de différents types cellulaires, dans des contextes physiologiques variés. Ainsi, il a été montré que les lymphocytes B libèrent des exosomes porteurs de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, qui jouent un rôle dans la présentation antigénique (Raposo et al., J. Exp. Med. 183 (1996) 1161). De même, il a été montré que les cellules dendritiques produisent des exosomes (également désignés dexosomes), ayant des caractéristiques structurales et fonctionnelles particulières, et jouant un rôle dans la médiation de la réponse immune, notamment dans la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (Zitvogel et al., Nature Medicine 4 (1998) 594). Il a aussi été montré que les cellules tumorales sécrètent, de manière régulée, des exosomes particuliers

(désignés également texosomes), porteurs d'antigènes tumoraux et capables de présenter ces antigènes ou de les transmettre aux cellules présentatrices d'antigènes (demande de brevet n° FR 98/01437). Il est également connu que les cellules de mastocytes accumulent les molécules dans les compartiments vésiculaires intracellulaires, qui peuvent être sécrétés sous l'effet de signaux (Smith et Weis, Immunology Today 17 (1996) 60). D'une manière générale, il semble donc que les cellules émettent des signaux et communiquent entre elles par l'intermédiaire de vésicules membranaires qu'elles libèrent, qui peuvent être porteuses de motifs antigéniques, de molécules du CMH, ou de tout autre signal (cytokine, facteur de croissance, etc.), qui présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles spécifiques, et sont produites dans des situations physiologiques différentes. Ces vésicules, et en particulier les exosomes, représentent donc un produit particulièrement intéressant pour des applications diagnostique, vaccinal, thérapeutique ou pour véhiculer des molécules d'intérêt. Il serait donc particulièrement intéressant de disposer d'une méthode efficace et utilisable à l'échelle industrielle, pour préparer des vésicules membranaires compatibles avec un usage biologique, notamment un usage pharmacologique.

Les méthodes classiques de préparation des vésicules membranaires (e.g., des exosomes) mettent en oeuvre une série d'étapes de centrifugation différentielle permettant de séparer les vésicules des cellules ou des débris cellulaires présents dans le milieu de culture. Ainsi, les documents cités ci-avant décrivent essentiellement la préparation de vésicules par une série de centrifugations à 300g, 10 000g et 70 000 ou 100 000g, le culot obtenu étant alors repris dans une solution saline, pour constituer une solution concentrée d'exosomes. Cette préparation peut être analysée par des techniques biochimiques classiques permettant d'évaluer la composition protéique des exosomes. Une technique biochimique préférée consiste en une électrophorèse en milieu dénaturant associée à une coloration des protéines totales ou à la détection de protéines spécifiques à l'aide d'anticorps selon la technique de western blot. La détection des exosomes dans la préparation finale peut être

réalisée de façon directe par microscopie électronique après fixation de la préparation par une solution de glutaraldéhyde à 4%.

Selon ce procédé, les niveaux de pureté des exosomes sont satisfaisants dans la mesure où de telles préparations ont permis de mettre en évidence l'activité biologique et leurs propriétés antitumorales dans des modèles animaux. Néanmoins ces procédés antérieurs de préparation par centrifugation ne permettent pas de séparer finement les vésicules membranaires (e.g., exosomes) des protéines cellulaires ou de certains composants macromoléculaires (ADN, ARN) ou complexes macromoléculaires. Ces procédés n'excluent donc pas la présence d'agents biologiques contaminants non identifiés, incompatibles avec une utilisation thérapeutique chez l'homme. De plus ces étapes sont difficilement extrapolables à l'échelle industrielle, notamment lorsque des volumes importants doivent être traités, ou pour des applications ex vivo autologues (i.e., patient par patient), où le procédé doit généralement être mis en oeuvre en système confiné.

La présente invention apporte à présent une solution à ce problème. L'invention décrit en effet de nouveaux procédés permettant la préparation (c'est-à-dire l'isolement et/ou la purification) de vésicules membranaires dans des conditions compatibles avec une utilisation industrielle et des applications pharmacologiques. Ainsi, les procédés de l'invention peuvent être appliqués aussi bien pour des préparations individualisées d'exosomes autologues, que pour des préparations d'exosomes obtenus à partir de lignées cellulaires établies, en vue d'utilisation expérimentales, biologiques ou à des fins de vaccination prophylactiques ou thérapeutiques, par exemple.

La présente invention repose plus particulièrement sur l'utilisation de méthodes séparatives par chromatographie pour la préparation de vésicules membranaires, et notamment pour séparer les vésicules membranaires d'éventuelles entités biologiques contaminantes.

Plus particulièrement un premier objet de l'invention réside dans un procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions.

5 En effet, la demanderesse a maintenant montré que les vésicules membranaires, notamment les exosomes, pouvaient être purifiés par chromatographie d'échange d'anions. Ainsi, de manière inattendue, il est montré dans la présente demande que les exosomes sont résolus en un pic homogène après chromatographie par échange d'anions. Ce résultat est tout à fait inattendu
10 dans la mesure où les exosomes sont des objets supramoléculaires complexes composés entre autre d'une membrane entourant un volume interne comportant entre autre des protéines solubles. De plus les exosomes contiennent des protéines membranaires.

Un objet plus particulier de l'invention concerne donc un procédé de
15 préparation, en particulier de purification de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique, comprenant au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il peut s'agir d'un échange d'anions fort ou faible, préférentiellement fort. Par ailleurs, dans un
20 mode particulier de mise en oeuvre, la chromatographie est réalisée sous pression. Il peut ainsi s'agir plus particulièrement d'une chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Différents types de supports peuvent être employés pour la réalisation de la chromatographie d'échange d'anions. On peut citer plus préférentiellement la
25 cellulose, le poly(styrène-divinylbenzène), l'agarose, le dextran, l'acrylamide, la silice, le copolymère éthylène glycol-méthacrylate, ou des mélanges, par exemple des mélanges agarose-dextran. A cet égard, on peut mentionner à titre illustratif différents matériels de chromatographie composé de supports tels qu'énoncés ci-dessus, et notamment les gels Source, Poros, Sepharose, sephadex, Trisacryl,

TSK-gel SW ou PW, Superdex, Toyopearl HW et sephacryl, par exemple, qui conviennent pour la mise en oeuvre de la présente invention.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre, l'invention concerne donc un procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique, comprenant au moins une étape au cours de laquelle l'échantillon
5 biologique est traité par chromatographie d'échange d'anions sur un support choisi parmi la cellulose, le poly(styrène-divinylbenzène), la silice, l'acrylamide, l'agarose, le dextran, le copolymère éthylène glycol-méthacrylate, seuls ou en mélanges, éventuellement fonctionnalisés.

10 Par ailleurs, pour améliorer la résolution chromatographique, il est préférable dans le cadre de l'invention d'utiliser des supports sous forme de billes. Idéalement, il s'agit de billes présentant un diamètre homogène et calibré, et possédant une porosité suffisamment élevée pour permettre la pénétration des objets à chromatographier (i.e., les exosomes). Ainsi, étant donné le
15 diamètre des exosomes (généralement compris entre 50 et 100 nm) il est préférable pour la mise en oeuvre de l'invention d'utiliser des gels de porosité élevée, en particulier comprise entre environ 100 nm et 5 μ m, plus préférentiellement entre environ 100 nm et environ 1 μ m.

Pour la chromatographie d'échange d'anions, le support utilisé doit être
20 fonctionnalisé au moyen d'un groupement capable d'interagir avec une molécule anionique. Généralement, ce groupement est constitué d'une amine pouvant être tertiaire ou quaternaire ce qui définit respectivement un échangeur d'anions faible ou fort.

Dans le cadre de la présente invention, il est particulièrement avantageux
25 d'utiliser un échangeur d'anions fort. Ainsi on utilise préférentiellement selon l'invention un support de chromatographie tel qu'indiqué ci-dessus, fonctionnalisé par des amines quaternaires. Selon un mode de réalisation plus particulier de l'invention, la chromatographie d'échange d'anions est donc réalisée sur un support fonctionnalisé par une amine quaternaire. Encore plus

préférentiellement, il s'agit d'un support choisi parmi le poly(styrène-divinylbenzène), l'acrylamide, l'agarose, le dextran et la silice, seuls ou en mélanges, fonctionnalisé par une amine quaternaire.

Parmi les supports fonctionnalisés par une amine quaternaire, on peut
5 citer comme exemples les gels Source Q, Mono Q, Q Sepharose, Poros HQ et Poros QE, les gels de type Fractogel TMAE, et les gels Toyopearl Super Q.

Un support particulièrement préféré pour la réalisation de la chromatographie d'échange d'anions comprend du poly(styrène-divinylbenzène). Un exemple de ce type de gel utilisable dans le cadre de l'invention est le gel
10 Source Q, notamment Source 15 Q (pharmacia). Ce support présente l'avantage de pores internes très larges offrant ainsi peu de résistance à la circulation de liquide à travers le gel, tout en permettant une diffusion rapide des exosomes vers les groupements fonctionnels, paramètres particulièrement importants dans le cas des exosomes étant donné leur taille.

15 L'élution des composés biologiques retenus sur la colonne peut se faire de différentes manières, et en particulier au moyen du passage d'un gradient de concentration croissant d'une solution saline, par exemple de 0 à 2 M. On peut employer notamment une solution de chlorure de sodium, dans des concentrations variant de 0 à 2M, par exemple. La détection des différentes
20 fractions ainsi purifiées se fait par mesure de leur densité optique (DO) en sortie de colonne au moyen d'une lecture spectro-photométrique en continu. A titre indicatif, dans les conditions utilisées dans les exemples, les fractions comprenant les vésicules membranaires ont été éluées à une force ionique de 400 mM environ.

25 Différents types de colonnes peuvent être utilisés pour réaliser cette étape chromatographique, selon les besoins et les volumes à traiter. Par exemple, selon les préparations, il est possible d'utiliser une colonne de 100µl environ jusqu'à 10 ml ou plus. Ainsi, les supports disponibles ont une capacité pouvant atteindre par exemple 25 mg de protéines/ml. De ce fait, une colonne de 100 µl

possède une capacité de l'ordre de 2,5 mg de protéines ce qui, compte tenu des échantillons considérés, peut permettre de traiter des surnageants de culture de 2 l environ (qui, après concentration d'un facteur 10 à 20 par exemple, représentent des volumes de 100 à 200 ml par préparation). Il est bien entendu
5 que des volumes supérieurs peuvent également être traités, en augmentant le volume de la colonne par exemple.

Par ailleurs, pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est également possible de combiner l'étape de chromatographie d'échange d'anions avec une étape de chromatographie de perméation de gel. Ainsi, selon un mode
10 de mise en oeuvre particulier de l'invention, une étape de chromatographie de perméation de gel est ajoutée à l'étape d'échange d'anions, soit avant, soit après l'étape de chromatographie d'échange d'anions. De préférence, dans ce mode de mise en oeuvre, l'étape de chromatographie de perméation a lieu après l'étape d'échange d'anions. En outre, dans une variante particulière de
15 réalisation, l'étape de chromatographie d'échange d'anions est remplacée par l'étape de chromatographie de perméation de gel. La présente demande montre en effet que les vésicules membranaires peuvent être aussi purifiées en utilisant la chromatographie liquide par perméation de gel, en particulier lorsque cette étape est combinée à une chromatographie d'échange d'anions ou à d'autre(s)
20 étape(s) de traitement de l'échantillon biologique, comme il sera décrit en détails plus loin.

Pour la réalisation de l'étape chromatographique de perméation de gel, on utilise de préférence un support choisi parmi la silice, l'acrylamide, l'agarose, le dextran, le copolymère éthylène glycol-méthacrylate, ou des mélanges, par
25 exemple des mélanges agarose-dextran. A titre illustratif, pour la chromatographie de perméation de gel, on utilise avantageusement un support tel que le Superdex 200HR (Pharmacia), le TSK G6000 (TosoHaas) ou encore un Séphacryl S (Pharmacia).

Le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre à partir de différents échantillons biologiques. En particulier, il peut s'agir d'un fluide biologique provenant d'un sujet (moelle osseuse, sang périphérique, etc.), d'un surnageant de culture, d'un lysat cellulaire, d'une solution prépurifiée, ou de tout autre composition comprenant des vésicules membranaires.

A cet égard, dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'échantillon biologique est un surnageant de culture de cellules productrices de vésicules membranaires.

Par ailleurs, selon un mode de mise en oeuvre préféré de l'invention, l'échantillon biologique est traité, préalablement à l'étape chromatographique, pour être enrichi en vésicules membranaires (étape d'enrichissement). Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, la présente invention concerne un procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

b) une étape d'enrichissement de l'échantillon en vésicules membranaires, et,

c) une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions et/ou par chromatographie de perméation de gel.

Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'échantillon biologique est un surnageant de culture traité de manière à être enrichi en vésicules membranaires. En particulier, l'échantillon biologique peut être constitué d'une solution prépurifiée obtenue à partir d'un surnageant de culture d'une population de cellules productrices de vésicules membranaires ou d'un fluide biologique par des traitements tels que centrifugation, clarification, ultrafiltration et/ou nanofiltration, en particulier par clarification et ultrafiltration..

Un procédé préféré de préparation de vésicules membranaires au sens de la présente invention comprend donc plus particulièrement les étapes suivantes:

a) la culture d'une population de cellules productrices de vésicules membranaires (e.g. d'exosomes) dans des conditions permettant la libération des vésicules,

5 b) une étape d'enrichissement de l'échantillon en vésicules membranaires, et,

c) une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions et/ou par chromatographie de perméation de gel.

10 Comme indiqué ci-avant, l'étape d'enrichissement de l'échantillon (e.g., du surnageant) peut comprendre une ou plusieurs étapes de centrifugation, clarification, ultrafiltration et/ou nanofiltration du surnageant. Dans un mode de réalisation particulier, l'étape d'enrichissement comprend (i) une étape d'élimination des cellules et/ou débris cellulaires (étape de clarification), éventuellement suivie de (ii) une étape de concentration.

15 L'élimination des cellules et/ou débris cellulaires peut être réalisée par exemple par centrifugation de l'échantillon à une vitesse faible, de préférence inférieure à 1000g, par exemple comprise entre 100 et 500g. Des conditions préférées de centrifugation lors de cette étape sont de 300g environ, pendant une période comprise entre 1 et 15 minutes par exemple.

20 L'élimination des cellules et/ou débris cellulaires peut également être réalisée par filtration de l'échantillon, éventuellement en combinaison avec la centrifugation décrite ci-dessus. La filtration peut être réalisée en particulier par des filtrations successives au moyen de filtres ayant une porosité décroissante. A cet égard, on utilise préférentiellement des filtres ayant une porosité supérieure à 0,2 μm , par exemple comprise entre 0,2 et 10 μm . On peut utiliser en particulier
25 une succession de filtres ayant une porosité de 10 μm , 1 μm , 0,5 μm puis 0,22 μm .

Une étape de concentration peut également être réalisée, de manière à diminuer les volumes d'échantillon à traiter lors des étapes chromatographiques.

Ainsi, la concentration peut être obtenue par centrifugation de l'échantillon à des vitesses élevées, par exemple comprises entre 50 000 et 100 000g, de manière à culotter les vésicules membranaires. A cet égard, il peut s'agir d'une série de centrifugations différentielles, avec la dernière centrifugation effectuée autour de
5 70 000g environ. Les vésicules membranaires ainsi culottées peuvent ensuite être reprise dans un volume plus faible et dans un tampon approprié pour les étapes ultérieures du procédé.

L'étape de concentration peut également être réalisée par ultrafiltration. Cette ultrafiltration permet en fait à la fois de concentrer le surnageant et
10 d'effectuer une première purification des vésicules. Selon un mode de réalisation préféré, l'échantillon biologique (par exemple le surnageant) est soumis à une ultrafiltration, de préférence une ultrafiltration tangentielle. L'ultrafiltration tangentielle consiste à concentrer et fractionner une solution entre deux compartiments (filtrat et rétentat), séparés par des membranes de seuils de
15 coupure déterminés. La séparation est réalisée par application d'un flux dans le compartiment retentat et d'une pression transmembranaire entre ce compartiment et le compartiment filtrat. Différents systèmes peuvent être utilisés pour réaliser l'ultrafiltration, comme par exemple des membranes spirales (Millipore, Amicon), membranes planes ou fibres creuses (Amicon, Millipore,
20 Sartorius, Pall, GF, Sepracor). On utilise avantageusement dans le cadre de l'invention des membranes ayant un seuil de coupure inférieur à 1000 kDa, de préférence compris entre 300 kDa et 1000 kDa, encore plus préférentiellement entre 300 kDa et 500 kDa.

Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, l'échantillon
25 biologique est donc obtenu par traitement d'un surnageant de culture de cellules productrices de vésicules membranaires, par une étape de filtration au moins.

Dans un autre mode particulier de réalisation de l'invention, l'échantillon biologique est obtenu par traitement d'un surnageant de culture de cellules

productrices de vésicules membranaires, par une étape de centrifugation au moins.

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, l'échantillon biologique est obtenu par traitement d'un surnageant de culture de cellules productrices de vésicules membranaires, par une étape d'ultrafiltration au moins.

Un procédé préféré de préparation plus particulier de vésicules membranaires au sens de la présente invention comprend les étapes suivantes :

a) la culture d'une population de cellules productrices de vésicules membranaires (e.g. d'exosomes) dans des conditions permettant la libération des vésicules,

b) le traitement du surnageant de culture pour produire un échantillon biologique enrichi en vésicules membranaires (e.g. en exosomes) par une étape d'ultrafiltration au moins, et

c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel.

Dans un mode préféré de mise en oeuvre, l'étape b) ci-dessus comprend une filtration du surnageant de culture, suivie d'une ultrafiltration, de préférence tangentielle.

Par ailleurs, après l'étape c), le matériel récolté peut, le cas échéant, être soumis à un ou plusieurs étapes supplémentaires d) de traitement et/ou filtration, notamment dans un but de stérilisation. Pour cette étape de traitement par filtration, on utilise préférentiellement des filtres ayant un diamètre inférieur ou égal à 0,3 μm , encore plus préférentiellement inférieur ou égal à 0,25 μm . De tels filtres sont par exemple des filtres d'un diamètre 0,22 μm .

Après l'étape d), le matériel obtenu est par exemple distribué dans des dispositifs appropriés tels que flacons, tubes, poches, seringues, etc., dans un milieu approprié de conservation. Les vésicules purifiées ainsi obtenues peuvent être conservées au froid, congelées, ou utilisées extemporanément.

Un procédé de préparation particulier au sens de l'invention comprend donc au moins les étapes suivantes :

c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel, et,

5 d) une étape de filtration, notamment de filtration stérilisante, du matériel récolté après l'étape a).

Dans une première variante de réalisation, le procédé de l'invention comprend :

10 c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie d'échange d'anions, et,

d) une étape de filtration, notamment de filtration stérilisante, du matériel récolté après l'étape a).

Dans une autre variante de réalisation, le procédé de l'invention comprend:

15 c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie de perméation de gel, et,

d) une étape de filtration, notamment de filtration stérilisante, du matériel récolté après l'étape a).

20 Selon une troisième variante de réalisation, le procédé de l'invention comprend :

c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie d'échange d'anion suivie ou précédée d'une chromatographie de perméation de gel, et,

25 d) une étape de filtration, notamment de filtration stérilisante, du matériel récolté après l'étape a).

Les résultats présentés dans les exemples montrent que l'injection d'une préparation d'exosomes dans la colonne de chromatographie permet d'obtenir

des pics d'absorption symétriques, qui sont parfaitement résolus (Fig. n°1). Les différentes fractions ainsi isolées sont analysables par des techniques classiques d'électrophorèse des protéines en gel dénaturant suivies de techniques de coloration par du bleu de Coumassie ou de techniques de détection de protéines spécifiques à l'aide d'anticorps. Il est ainsi possible de montrer que le pic élué en chromatographie d'échange d'anions par une solution saline de 400 mM possède un profil protéique identique à celui d'une préparation d'exosomes classiquement préparée (Fig. n°2). Ceci permet *de facto* de caractériser les pics élués à des concentrations salines plus faibles ou plus fortes comme relatifs à des entités biologiques distinctes, contaminantes.

En outre, les résultats présentés dans les exemples montrent également que la méthode de l'invention permet de détecter l'éventuelle contamination de la préparation par des protéines majoritaires du milieu de culture telles que la serum-albumine bovine. En effet, la chromatographie d'une solution étalon de serum-albumine bovine dans les conditions précédentes montre que celle-ci donne lieu à un pic élué à une concentration saline distincte de celle des exosomes (Fig. n°3)

Le procédé de l'invention permet donc (i) de purifier des vésicules membranaires dans des conditions de qualité et de quantité compatibles avec un usage pharmacologique, et (ii) de révéler l'existence d'entités biologiques distinctes et contaminantes au sein de l'échantillon biologique traité.

Le procédé de l'invention peut être appliqué à la préparation de vésicules membranaires d'origines variées. Ainsi, il peut s'agir en particulier d'exosomes produits par des cellules présentatrices d'antigènes, ou par des cellules tumorales, notamment. En outre, il peut s'agir de cellules primaires, par exemple en culture, ou également de lignées établies, par exemple de lignées immortalisées de cellules productrices de vésicules membranaires. Il peut s'agir de cellules d'origine mammifère, en particulier d'origine murine ou humaine.

Dans un mode particulier de l'invention, les vésicules membranaires sont des vésicules produites par des cellules présentatrices d'antigènes, notamment des cellules dendritiques, des lymphocytes B, des macrophages et des mastocytes, éventuellement après sensibilisation de celles-ci à un ou plusieurs
5 antigènes choisis. Une application particulièrement préférée de la présente invention réside dans la préparation de vésicules membranaires produites par des cellules dendritiques. A cet égard, il peut s'agir de cellules dendritiques humaines ou animales, notamment humaines ou murines. Ces cellules peuvent être des cellules primaires, récoltées à partir de fluides biologiques d'un sujet ou
10 produites ex vivo à partir de cellules précurseur, ou également des cellules de lignées établies, par exemple immortalisées avec un oncogène (EP 701 604).

Un objet particulier de la présente invention réside dans un procédé de préparation de vésicules membranaires (dexosomes), caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 15 a) l'obtention d'une population de cellules dendritiques,
- b) la culture des cellules dendritiques dans des conditions permettant la production de vésicules membranaires (dexosomes) et,
- c) la purification des vésicules membranaires (dexosomes) par un procédé comprenant au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions, dans
20 les conditions définies ci-avant.

Un mode de réalisation plus préféré réside dans un procédé de préparation de dexosomes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) l'obtention d'une population de cellules dendritiques,
- 25 b) la culture des cellules dendritiques dans des conditions permettant la production de dexosomes,

c) le traitement du surnageant de culture pour produire un échantillon biologique enrichi en dexosomes, notamment par une étape d'ultrafiltration au moins, et,

5 d) la purification des dexosomes par un procédé comprenant au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel, dans les conditions définies ci-avant.

10 Plus particulièrement, pour la mise en oeuvre de cette variante de l'invention, les cellules dendritiques sont préférentiellement obtenues à partir d'un échantillon biologique provenant d'un sujet, par exemple de moelle osseuse ou de sang périphérique.

15 A cet égard, les techniques de production de cellules dendritiques ont été décrites dans l'art antérieur et peuvent être mises en oeuvre par l'homme du métier (voir notamment les techniques décrites dans la demande PCT/FR98/01431, incorporée à la présente par référence). Les cellules dendritiques peuvent ainsi être préparées à partir de cellules souches du système immunitaire, à partir de précurseurs monocytes ou encore isolées directement sous forme différenciée (Revue par Hart, Blood 90 (1997) 3245).

20 Une méthodologie privilégiée dans le cadre de la présente invention repose sur la production de cellules dendritiques à partir de précurseurs monocytes ou de moelle osseuse. Plus particulièrement, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention des cellules dendritiques obtenues par traitement de précurseurs monocytes (contenus dans le sang ou la moelle) en présence d'une combinaison GM-CSF+IL-4 ou GM-CSF+IL-13.

25 Par ailleurs, pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser une population de cellules dendritiques comprenant des cellules dendritiques immatures. Avantageusement, on utilise une population de cellules dendritiques composée principalement (i.e., au moins 60%, de préférence 70%) de cellules dendritiques immatures.

L'étape d'obtention des cellules dendritiques peut donc comprendre avantageusement la préparation d'une population de cellules dendritiques comprenant des cellules dendritiques immatures, en particulier d'origine humaines, notamment à partir de précurseurs monocytes, plus particulièrement
5 par traitement avec une combinaison de cytokines telle que GM-CSF+IL-4 ou GM-CSF+IL-13.

Par ailleurs, il est également possible d'utiliser dans le cadre de la présente invention des populations de cellules dendritiques immortalisées. Il peut s'agir de lignées de cellules dendritiques immortalisées (lignée D1 par exemple,
10 ou toute autre lignée produite par exemple par introduction de l'oncogène myc dans les cellules dendritiques). Il peut également s'agir de cellules dendritiques préparées puis immortalisées in vitro. L'intérêt de cellules dendritiques immortalisées réside dans la constitution de banques de cellules sensibilisées à des groupes d'antigènes donnés, utilisables industriellement pour préparer des
15 dexosomes susceptibles d'être administrés à des familles entières de patients.

Pour produire les vésicules membranaires (dexosomes), les cellules dendritiques peuvent être simplement cultivées dans des conditions conventionnelles connues de l'homme du métier. Avantageusement, néanmoins, ces cellules sont cultivées en dans des conditions stimulant la production des
20 dexosomes, en particulier en présence de facteurs capables de stimuler la production des dexosomes, notamment d'une cytokine telle que l'interféron gamma, l'interleukine-10 ou l'interleukine-12 (voir par exemple la demande PCT/FR98/01431). Dans un mode de mise en oeuvre préféré du procédé de l'invention, les cellules dendritiques sont donc cultivées, au cours de l'étape b) ci-
25 dessus, dans des conditions stimulant la production des vésicules membranaires.

D'autre part, dans une variante particulière de réalisation, les cellules dendritiques sont sensibilisées à un antigène, préalablement à la production des vésicules membranaires. Ce mode de réalisation permet ainsi de charger les

cellules dendritiques en antigène(s) particulier(s), de manière à produire des dexosomes ayant un caractère immunogène donné. La sensibilisation peut être réalisée par différentes techniques connues en soi, comprenant par exemple la mise en contact des cellules avec des peptides antigéniques, des antigènes, des complexes protéiques, des cellules ou membranes de cellules exprimant des antigènes, des corps apoptotiques, des vésicules membranaires, des liposomes, des ARN tumoraux ou tout acide nucléique codant pour un ou plusieurs antigènes, déterminants antigéniques ou épitopes (éventuellement véhiculés par un vecteur viral ou non viral), etc (voir par exemple la demande PCT/FR98/01431). Dans un mode préféré, la sensibilisation est réalisée par incubation avec des peptides, antigènes, ARN ou acides nucléiques. Il est entendu que la présente demande n'est pas limitée à des techniques de sensibilisation ou de production des cellules dendritiques.

Une autre application particulièrement avantageuse de la présente invention réside dans la préparation de vésicules membranaires produites par des cellules tumorales, notamment humaines. Il peut s'agir en particulier de toute cellule provenant d'une tumeur solide ou liquide ainsi que de cellules transformées ou immortalisées in vitro. On peut mentionner plus préférentiellement les tumeurs solides, hématopoïétiques ou ascitiques.

Une application particulière de la présente invention réside également dans la préparation de vésicules membranaires comprenant une ou plusieurs molécules hétérologues, en particulier recombinantes. Ainsi, il est en effet possible, par exemple, de modifier génétiquement des cellules productrices de vésicules membranaires (par exemple des lignées de mastocytes) pour faire exprimer, dans ou à la surface des vésicules qu'elles produisent, des molécules d'intérêt. La présente invention peut également permettre de purifier de telles vésicules modifiées.

De manière plus générale, l'invention peut être appliquée à la préparation de vésicules membranaires produites par tout type cellulaire, en particulier de

vésicules de type exosome, ayant de préférence un diamètre inférieur à environ 100 nm. Il peut s'agir notamment de cellules de macrophages, mastocytes, réticulocytes, etc. Pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, nous avons utilisé des préparations d'exosomes provenant de lignées cellulaires telles que
5 des lignées de cellules tumorales (TS/A) ou des lignées de cellules dendritiques murines (D1). Les résultats obtenus sont directement transposables à des cultures primaires telles que des cellules tumorales ou des cellules dendritiques humaines, cultivables dans des conditions industriellement acceptables. Le procédé de l'invention peut ainsi être mis en oeuvre comme étape de purification
10 des exosomes dans le cadre de leur utilisation en thérapeutique humaine.

Les vésicules membranaires ainsi obtenues constituent, selon leur origine, des outils d'étude des cancers ou de la régulation du système immunitaire, de transfert de molécules, de production d'anticorps, de marquage, de diagnostique, de constitution de banques, des principes de vaccin ou de médicament, etc.

15 En outre le procédé de l'invention peut également être utilisé comme méthode pour un contrôle de qualité sur la présence éventuelle de contaminants (notamment de protéines contaminantes) dans le milieu de culture ou dans des préparations de vésicules membranaires.

A cet égard, la présente invention peut donc être mise en oeuvre aussi
20 bien dans une méthode préparative de vésicules membranaires que dans un système analytique permettant de contrôler la qualité d'une préparation de vésicules membranaires, quelle que soit leur méthode de préparation.

La présente invention concerne donc également un procédé de contrôle de la présence de contaminants, notamment d'origine protéique ou nucléique,
25 dans une préparation de vésicules membranaires, notamment d'exosomes, comprenant le traitement d'une fraction de ladite préparation par une étape au moins de chromatographie d'échange d'anions, et la mise en évidence de la présence de contaminants.

L'invention concerne aussi, de manière générale, l'utilisation de la chromatographie d'échange d'anions, en particulier de type liquide à haute performance, pour la préparation ou la purification de vésicules membranaires.

5 L'invention a encore pour objet les vésicules membranaires préparées par le procédé de l'invention, ainsi que toute composition comprenant de telles vésicules.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

10

Légende des figures

Figure n° 1 : Profil d'élution après chromatographie par échange d'anions d'un échantillon exosomes préparés par centrifugation différentielle

15 Figure n° 2 : Analyse du profil protéique des différentes fractions d'élution d'une préparation d'exosomes par électrophorèse en SDS PAGE puis coloration par du bleu de Coomassie.

Figure n° 3 : Profil d'élution après chromatographie par échange d'anions d'une solution étalon de sérum-albumine bovine.

20 Figure n° 4 : Schéma de traitement d'un échantillon biologique comprenant des vésicules membranaires par ultrafiltration tangentielle.

Techniques générales de culture cellulaire et de biologie moléculaire

25

1) Cultures cellulaires

La lignée de cellules TS/A est une lignée de cellules murines établie à partir d'un carcinome mammaire spontané. Cette lignée est cultivée à 37°C en présence de 5% de CO₂ en milieu RPMI en présence de 10% de sérum de veau foetal (Dominique Dutcher).

- 5 Les lignées de cellules dendritiques sont maintenues dans un milieu IMDM contenant 10% de sérum bovin foetal inactivé, 2 mM de L-glutamine, 50 µM de 2-βME, 100 UI/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine.

2) Analyse des protéines par SDS PAGE

- 10 20 µl d'échantillon est dilué dans le tampon de Laemmli (Nature 227 (1970) p680-685) puis soumis à une dénaturation thermique à 95°C pendant 10 mn puis chargé sur des gels d'acrylamide 10% (Novex 1mmx10 puits). Après migration, les gels sont colorés au bleu de Coomassie.

15 Exemples

1) Chromatographie par échange d'anions d'une préparation d'exosomes produits par des cellules tumorales (lignée TS/A) : analyse par SDS PAGE du profil protéique des différentes fractions éluées.

20

Cet exemple illustre comment une étape de chromatographie d'échange d'anions peut permettre de séparer des impuretés d'une préparation d'exosomes.

1.1. Protocole :

- 25 Dans cette expérience, le matériel de départ est constitué d'un concentrat d'exosomes préparés par centrifugation différentielle à partir d'un surnageant de culture de cellules TS/A permettant de séparer les exosomes des cellules ou des débris cellulaires présents dans le milieu de culture. La première centrifugation

est réalisée a basse vitesse (300g pendant 5 mn) afin de culotter les cellules en suspension présentent dans le surnageant de culture. Deux autres centrifugations (1200g pendant 20 mn puis 10 000g pendant 30 mn) permettent de culotter les débris cellulaires. Le surnageant ainsi clarifié est alors soumis a
5 une ultracentrifugation à haute vitesse de 70 000g pendant 1 heure permettant de culotter les exosomes. Cette préparation est alors lavée dans un grand volume de solution saline pour être recentrifugée dans les conditions précédentes. Le culot est alors repris dans un volume d'environ 100 µl de solution saline et constitue une solution concentrée d'exosomes. La quantité de
10 protéines est mesurée par la technique de Bradford (Biorad, Ivry, France). Ce concentrat présente une teneur en protéines totales comprise entre 500 et 1000 µg/ml.

40 µg de cette préparation d'exosomes dilués dans 500 µl de tampon Tris/HCL 50 mM pH sont injectés sur une colonne contenant du gel Source Q 15
15 (Pharmacia) équilibré dans une solution Tris/HCL 50 mM pH 8. Après rinçage, les espèces adsorbées sont éluées sur 30 volumes de colonne par un gradient linéaire de NaCl de 0 à 500 mM, puis par une solution de NaCl 2M. Les fractions d'élution sont analysées par spectrophotométrie à 260 et 280 nm. Les fractions d'élution sont regroupées en 5 cinq fractions majeures (de F1 à F5) afin de
20 pouvoir analyser leur profil protéique respectif. Les protéines de chaque fraction sont précipitées par 1/10 de volume, d'une solution d'acide trichloroacétique à 100 % puis rincées par une solution d'acétone. Les culots protéiques sont repris dans 20 µl de solution de Laemmli, et sont déposés sur un gel d'acrylamide SDS PAGE qui est alors coloré par du bleu de Coomassie.

25 1.2. Résultats :

Les profils d'élution à 260 et 280 nm sont représentés sur la figure 1. Les profils montrent la présence de 3 pics symétriques distincts, élués aux concentrations salines respectives de 105 mM, 400 mM et 2 M de NaCl.

L'analyse du profil protéique des fractions correspondant aux différents pics montre que le pic élué à 400 mM de NaCl possède un profil protéique identique à celui d'une préparation d'exosomes préparée classiquement par centrifugation (Figure N° 2). Le rapport entre les absorptions à 260 et 280 nm mesuré à une valeur de 0.8 est compatible avec celui décrit dans le cas des protéines.

Le pic élué (fraction F2) à 105 mM de NaCl présente en revanche un profil protéique différent montrant seulement deux bandes distinctes. Les mesures d'absorbance à 260 et 280 nm donnent un rapport de 1.6 suggérant la présence d'une association d'acides nucléiques et de protéines.

La fraction F5 élue à 2 molaire de NaCl correspond aux composés biologiques fortement associés à la colonne.

Il est donc possible de séparer les exosomes d'impuretés par une étape d'échange d'anions.

15

2) Chromatographie par échange d'anions d'une solution étalon de sérum-albumine bovine :

Cette technique de chromatographie par échange d'anions permet également d'évaluer le degré de contamination d'une préparation d'exosomes par les protéines présentes dans le milieu de culture. Ainsi, nous montrons en chromatographiant 10 µg d'une solution de sérum albumine bovine, correspondant à la protéine majoritaire du milieu de culture, que celle-ci est élue à 205 mM de NaCl sous forme d'un pic étroit distinguable des pics précédemment décrits dans le cas des exosomes.

25

3) Traitement d'un surnageant de culture contenant des exosomes par ultrafiltration.

Cet exemple montre qu'il est possible de concentrer les exosomes par ultrafiltration. De plus, la préparation exosomale est appauvrie en protéines contaminantes telle que les BSA.

Protocole : (Figure N° 4)

5 150 ml d'un surnageant de culture de cellules obtenu après centrifugation à 300 g de cellules TSA, sont soumis à une filtration sur un filtre de porosité de 0.22 μ m (Millipore). Le filtrat est dilué de moitié dans du PBS. Les 300 ml résultants sont filtrés tangentielllement avec une cassette de filtration (10 cm² de membrane) d'un seuil de coupure de 300 000 D (Sartorius).

10

Résultats :

7 ml de rétentat sont obtenus après 1 heure de filtration. Le rétentat, a été soumis une ultracentrifugation (79 000) pour culotter et analyser les exosomes. Une analyse par SDS-PAGE suivie de coloration au bleu de Coomassie a révélé
15 que, l'échantillon contenait significativement moins de BSA que la solution qui a été ultrafiltrée. De plus, des bandes protéiques spécifiques des exosomes produits à partir de TSA sont observées.

L'ultrafiltration peut donc être utilisée dans un procédé de purification d'exosomes afin de séparer ceux-ci de protéines contaminantes.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions.
- 5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions fort.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions et de perméation de gel.
- 10 4. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est un fluide biologique, un surnageant de culture, un lysat cellulaire ou une solution prépurifiée.
5. Procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins :
 - 15 b) une étape d'enrichissement de l'échantillon en vésicules membranaires, et,
 - c) une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions et/ou par chromatographie de perméation de gel.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend :
 - 20 a) la culture d'une population de cellules productrices de vésicules membranaires (e.g. d'exosomes) dans des conditions permettant la libération des vésicules,
 - b) une étape d'enrichissement de l'échantillon en vésicules membranaires, et,

c) une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions et/ou par chromatographie de perméation de gel.

7. Procédé selon les revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que l'étape d'enrichissement comprend une étape de clarification, éventuellement suivie d'une étape de concentration.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'étape d'enrichissement comprend une étape de centrifugation à faible vitesse et/ou une filtration.

9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que l'étape d'enrichissement comprend au moins une étape d'ultrafiltration, notamment tangentielle.

10. Procédé de préparation de vésicules membranaires, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la culture d'une population de cellules productrices de vésicules membranaires (e.g. d'exosomes) dans des conditions permettant la libération des vésicules,

b) le traitement du surnageant de culture pour produire un échantillon biologique enrichi en vésicules membranaires (e.g. en exosomes) par une étape d'ultrafiltration au moins, et

c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d) de filtration du matériel récolté.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les vésicules membranaires possèdent un diamètre compris entre 60 et 90 nm environ.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les vésicules membranaires sont des vésicules produites par des cellules présentatrices d'antigènes, notamment des cellules dendritiques des lymphocytes B, des macrophages et des mastocytes.

5 14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que les vésicules membranaires sont des vésicules produites par des cellules dendritiques, notamment humaines.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que les vésicules membranaires sont des vésicules produites par des cellules tumorales,
10 notamment humaines.

16. Procédé de préparation de vésicules membranaires caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) l'obtention d'une population de cellules dendritiques,

b) la culture des cellules dendritiques dans des conditions permettant la
15 production de vésicules membranaires et,

c) la purification des vésicules membranaires par un procédé comprenant au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions.

17. Procédé de préparation de vésicules membranaires, caractérisé en ce qu'il comprend :

20 a) l'obtention d'une population de cellules dendritiques,

b) la culture des cellules dendritiques dans des conditions permettant la production de vésicules membranaires,

c) le traitement du surnageant de culture pour produire un échantillon biologique enrichi en vésicules membranaires, notamment par une étape
25 d'ultrafiltration au moins, et,

d) la purification des vésicules membranaires par un procédé comprenant au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel.

18. Procédé selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que les
5 cellules dendritiques sont obtenues à partir d'un échantillon biologique provenant d'un sujet, par exemple de moelle osseuse ou de sang périphérique.

19. Procédé selon les revendications 16 à 18, caractérisé en ce que les cellules dendritiques sont immatures.

20. Procédé selon l'une des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que les
10 cellules dendritiques sont sensibilisées à un antigène, préalablement à la production des vésicules membranaires.

21. Procédé selon l'une des revendications 16 à 20, caractérisé en ce que, au cours de l'étape b), les cellules dendritiques sont cultivées dans des conditions stimulant la production des vésicules membranaires.

22. Utilisation de la chromatographie d'échange d'anions pour la préparation
15 ou la purification de vésicules membranaires.

23. Composition comprenant des vésicules membranaires préparées par le procédé selon l'une des revendications 1 à 21.

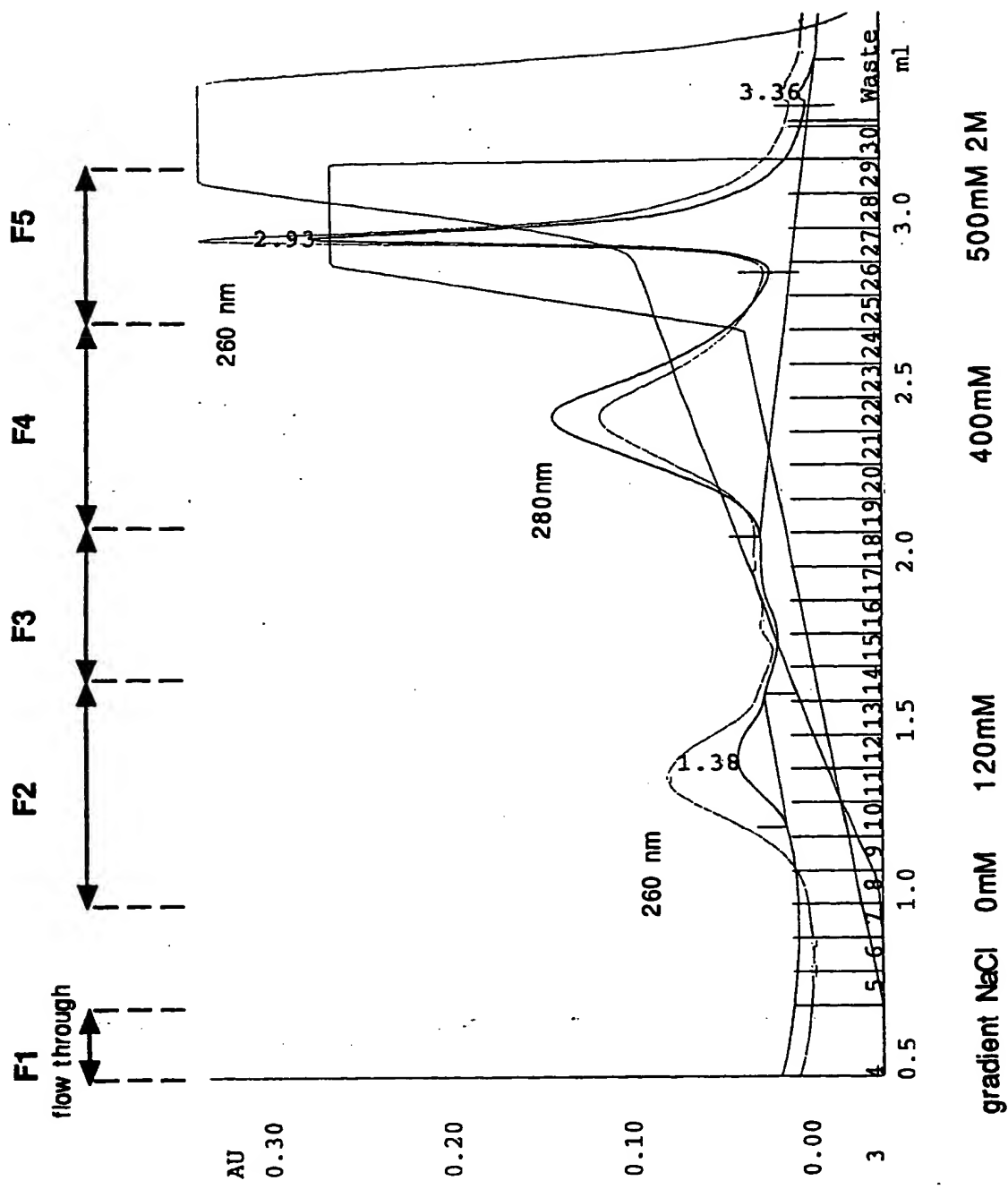


Figure 1

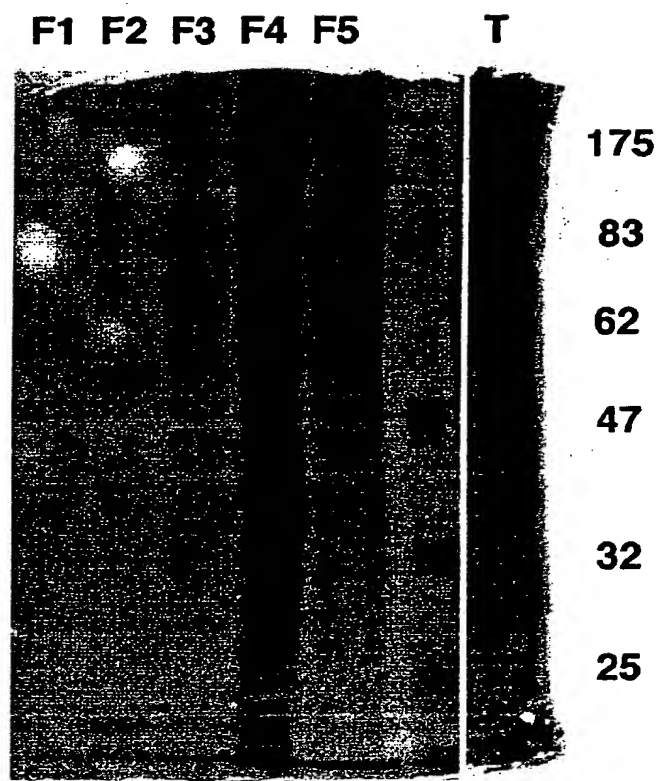


Figure 2

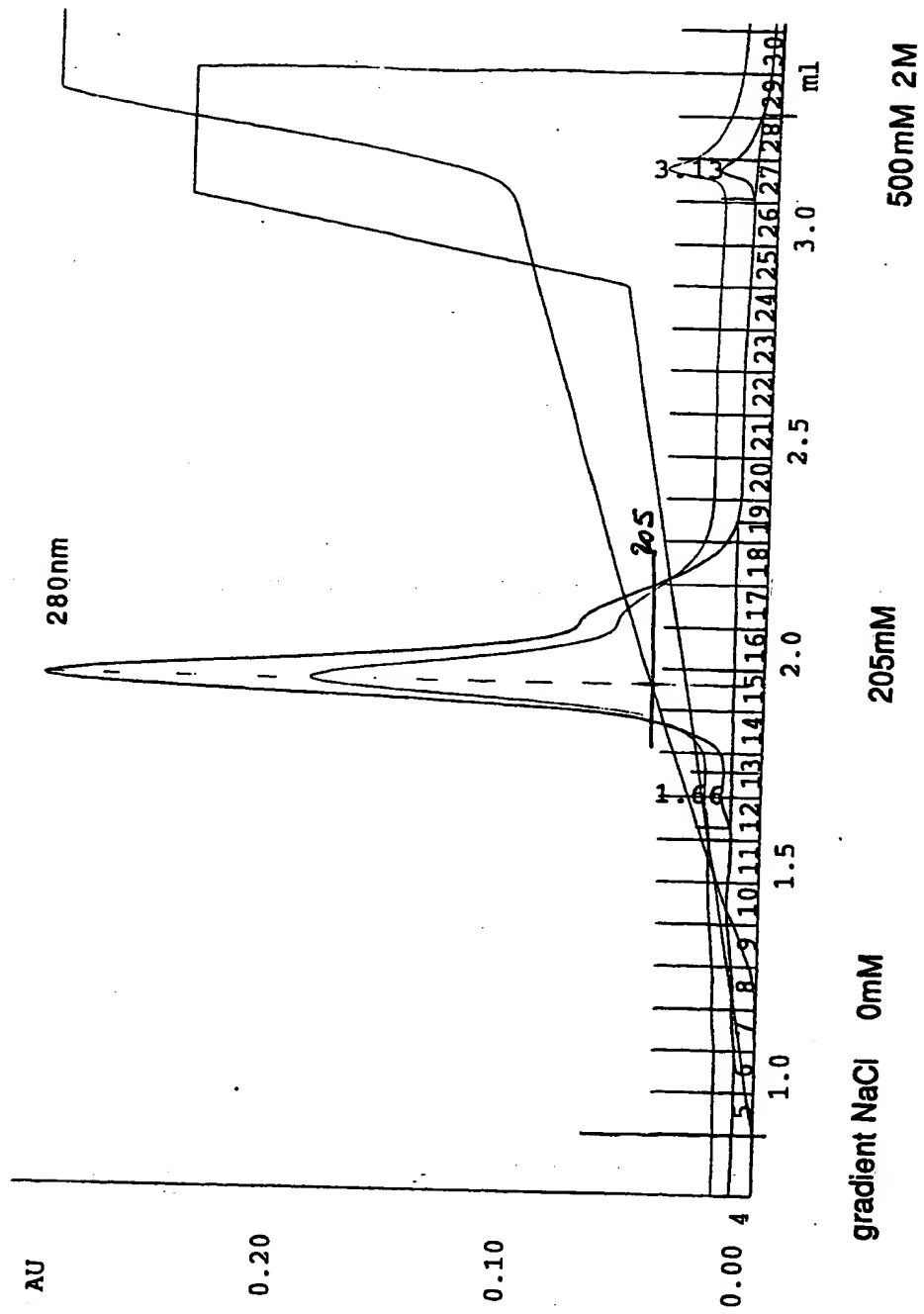


Figure 3

Filtration tangentielle

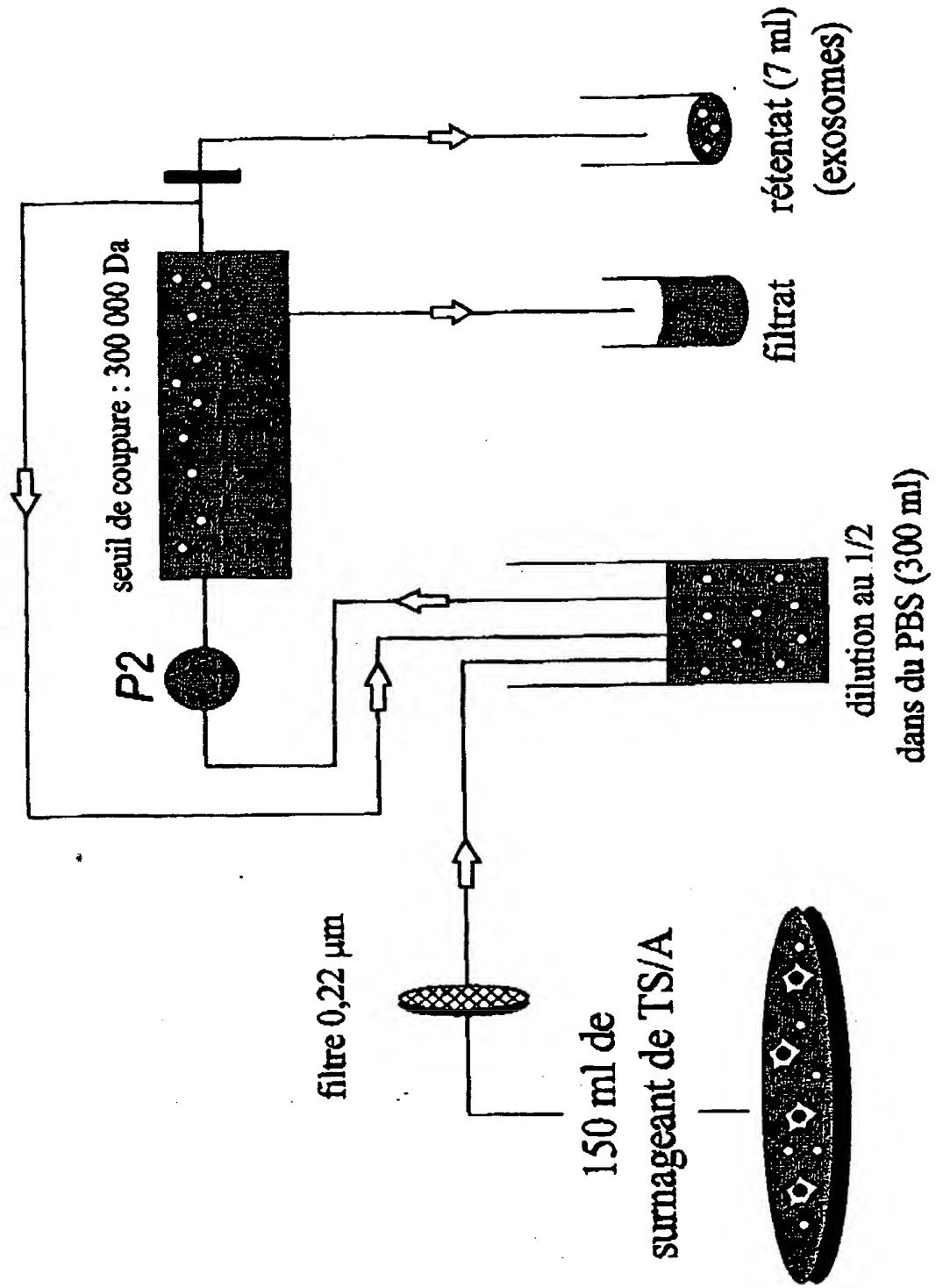


Figure 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)